

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 1001–1012

Die Bestimmung des anorganischen Phosphors auf dem (Cobas) Bio

(Direkte Methode ohne Enteiweißung)

Von H. G. Eisenwiener, J. M. Kindbeiter und M. Bellagamba¹⁾

Aus der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Sparte Diagnostica, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG,
CH-4133 Schweizerhalle

(Eingegangen am 25. August 1980/27. März 1981)

Zusammenfassung: Die direkte Molybdat-Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphors wurde auf den (Cobas) Bio Zentrifugalanalysator adaptiert. Es wurden die Testcharakteristika (Reaktionszeit, Linearität, Richtigkeit und Präzision) in der Serie und von Tag zu Tag evaluiert. Die Richtigkeit wurde mit Kontrollseren, drei verschiedenen Arten von Wiederfindungsversuchen und durch Parallelversuche überprüft. Da die Resultate der Bestimmung von anorganischem Phosphor sehr methoden- und verfahrensabhängig sind (mit/ohne Enteiweißung), wurden zur Beurteilung der Richtigkeit bei Paralleluntersuchungen noch folgende Verfahren mitgeführt: die Malachitgrün-Methode ohne und mit zwei verschiedenen Enteiweißungsverfahren, die Molybdat/*p*-Methylaminophenolsulfat-Methode mit und ohne Enteiweißung, die Molybdat/Vanadat-Methode mit Enteiweißung.

Es zeigte sich, daß die von uns bevorzugte direkte Molybdat-Methode sowohl mit Patientenmaterial als auch mit Kontrollseren innerhalb der allgemeinen Fehlergrenzen die gleichen Resultate wie die Malachitgrün-Methode ohne Enteiweißung ergab.

Determination of Inorganic Phosphorus on the (Cobas) Bio

(Direct Method without Deproteinization)

Summary: The direct molybdate method for the determination of inorganic phosphorus was adapted to the (Cobas) Bio centrifugal analyzer. We evaluated test characteristics such as reaction time, linearity range, accuracy and precision within series and from day to day. Accuracy was checked using control sera, three different types of recovery experiments, and by experiments running in parallel. Because the results of the determination of inorganic phosphorus depend greatly on the method and the procedure used (with/without deproteinization), we checked the accuracy not only by experiments running in parallel, but by comparison with the following methods: the malachite green method without and with two different techniques for deproteinization, the molybdate/*p*-methylaminophenol sulfate method with and without deproteinization, and the molybdate/vanadate method with deproteinization.

Using patients' sera as well as control sera, it was shown that the preferred molybdate method gave, within the normal range of errors, the same results as the malachite green method without deproteinization.

Einführung

Für die Bestimmung des sogenannten 'Anorganischen Phosphors' gibt es zahlreiche Bestimmungsv Verfahren. Prinzipiell ist zwischen Verfahren mit und ohne Enteiweißung zu unterscheiden. Oft wird gemäß Henry (1) als 'acid soluble phosphorus' der im Trichloressigsäure-Überstand gefundene Phosphatgehalt als anorganischer

Phosphor bezeichnet. Es wird dabei angenommen, daß das nach der Trichloressigsäure-Behandlung sich anschließende Bestimmungsv Verfahren nicht den im Überstand vorhandenen organisch gebundenen Phosphor (z. B. als Glycerat-2,3-bisphosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, ATP u. a.) miterfaßt bzw. daß unter den gewählten Reaktionsbedingungen aus diesen Verbindungen kein Phosphat freigesetzt wird.

Vom analytischen Standpunkt aus gesehen wären die vollenzymatischen Bestimmungsv Verfahren (2, 3, 4) als Methoden der Wahl anzusehen, da sie keine Enteiweißung und keine extremen pH-Verschiebungen erfordern. Durch eine zweckmäßige Pipettierfolge kann der jeweils

¹⁾ Auszugsweise als Posterpräsentation anlässlich der gemeinsamen Tagung der Österreichischen und der Schweizerischen Gesellschaft für Klinische Chemie am 6./7. Juni 1980 in Weinfelden, TG, Schweiz dargeboten (Bull. Schweiz. Ges. Klin. Chem. 21 (3), 83–85 (1980)).

probenspezifische Leerwert einfach erfaßt und berücksichtigt werden. Die Produktions- bzw. Konfektionierungsmöglichkeiten sind jedoch anscheinend bislang noch nicht so weit fortgeschritten, daß stabile und preisgünstige Reagenzien im Handel erhältlich sind.

Deshalb werden derzeit vor allem Farbttests zur Bestimmung des sogenannten 'Anorganischen Phosphors' eingesetzt. Bei diesen Bestimmungen sind zahlreiche Pipettierschritte und verschiedene Reagenzien erforderlich. Die Empfindlichkeit der einzelnen Verfahren ist sehr unterschiedlich. Besonders ist auf eine mögliche Beeinflussung durch auftretende Trübungen zu achten.

Über die prinzipielle Notwendigkeit der Durchführung einer Enteiweißung gehen die Meinungen der einzelnen Fachleute und der Fachgesellschaften auseinander. Es dürfte aber vom theoretischen Standpunkt aus günstiger sein, die Enteiweißung zu umgehen und die Phosphat-Bestimmung direkt auszuführen. Leider erfordern die bekannten Nachweisverfahren für anorganisches Phosphat meist ein saures Milieu, so daß auch bei den direkten Verfahren ein etwas zu hoher Phosphatgehalt gefunden wird. Die Enteiweißung kann umgangen werden, indem z. B. bei der Malachitgrün-Methode in 6 mol/l Harnstoff-Lösung gearbeitet wird (5). Eine andere Möglichkeit bietet der Zusatz von Detergenzien.

Nur durch Umgehung der Enteiweißung ist es bei den allermeisten Analysatoren möglich, die Bestimmung des sogenannten anorganischen Phosphors zu mechanisieren und zu automatisieren.

Für den (Cobas) Bio Zentrifugalanalysator wurde die Methode von *Daly & Ertingshausen* (6) re-evaluiert und als Autoblanking-Methode adaptiert. Die Enteiweißung wird durch Zusatz von Tween 80 umgangen. Durch unmittelbare Messung der Absorption nach der Überführung des Reaktionsgemisches aus Probe und Reagenz in den Meßteil der Küvette wird der probenspezifische Leerwert berücksichtigt. Als Meßgröße dient die Absorption des nicht reduzierten Phosphor-Molybdat-Komplexes bei 340 nm.

Geräte und Reagenzien

Gerät

(Cobas) Bio Zentrifugalanalysator (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, Schweiz).

Reagenzien

Ammoniumheptamolybdat z. A., $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1182), Schwefelsäure puriss. (Fluka 84720), Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 80, Atlas).

Gebrauchslösungen

Reagenz 1: 1,86 mmol/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ werden in 1 l 0,7 mol/l H_2SO_4 gelöst. Reagenz 2: 110 ml/l Tween 80.

Gebrauchsreagenz

Reagenz 1 und Reagenz 2 werden im Verhältnis 30 ml + 1 ml gemischt. Zu 15 ml Ammoniumheptamolybdatlösung in Schwefelsäure werden 0,5 ml Tween 80 zugesetzt.

Analysatoreinstellungen

Die Parameter für den Analysator sind auf dem (Cobas) Bio-Gerät in englischer Sprache angegeben; die in Klammern angegebenen Begriffe sind die entsprechenden Übersetzungen:

Units (Einheiten): 3 (= mmol/l) oder 8 (= mg/dl);

Calculation factor (Berechnungsfaktor): 0;

Standard 1 conc.: 0,5 mmol/l (1,55 mg/dl);

Standard 2 conc.: 1 mmol/l (3,1 mg/dl);

Standard 3 conc.: 2 mmol/l (6,2 mg/dl);

Limit (Grenze): 4 mmol/l (12,4 mg/dl);

Temperature (Temperatur): 37 °C;

Type of analysis (Analysentyp): 5;

Wavelength (Wellenlänge): 340 nm;

Sample volume (Probenvolumen): 5 µl;

Diluent volume (Verdünnungsmittelvolumen): 30 µl;

Reagent volume (Reagenzvolumen): 300 µl;

Incubation time (Inkubationszeit): 0;

Start reagent volume (Startreagenzvolumen): 0;

Time of first reading (Zeitpunkt der 1. Messung): 0,5 s;

Time interval (Zeitintervall): 60 s;

Number of readings (Anzahl der Messungen): 5 oder 11;

Blanking mode (Meßeinstellung): 1;

Printout mode (Art des Ausdrucks): 1.

Bei den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Einstellungen wurden auch andere Arten des Ausdrucks der Ergebnisse gewählt, wie z. B. Absorption oder Absorptionsdifferenz in Abhängigkeit der Zeit (Art des Ausdrucks 3 bzw. 5) oder Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten über alle Proben des Probentellers (Art des Ausdrucks 6). Auch die Temperatur und die Meßzeit sowie die Verhältnisse zwischen Probe-, Verdünnungsmittel- und Reagenzvolumina wurden bei den Optimierungsversuchen geändert.

Verschleppung (Carryover)

In der Folge des speziellen Pipettierprogramms mit Trennblase und Nachspülen mit destilliertem Wasser sowie anschließender Innen- und Außensäuberung der Nadel treten beim (Cobas) Bio keine Verschleppungsfehler auf (7).

Ergebnisse

Linearitätsbereich

Der Linearitätsbereich kann in einem weiten Bereich eingestellt werden. Bei den gewählten Testkonzentrationen wird dieser durch das Verhältnis von Proben- zu Reagenzvolumen, durch die Reaktionszeit und durch die Reaktionstemperatur bestimmt. Zielvorstellung war ein Linearitätsbereich von mindestens 4 mmol/l (etwa 12,4 mg/dl). Die Reaktionsdauer sollte 10–12 Minuten nicht übersteigen. Da im Serum-Milieu eine Reaktionsbeschleunigung auftritt, wurden die Versuche zur Festlegung des Linearitätsbereiches und der Reaktionszeit mit wäßrigen Lösungen von Phosphat durchgeführt. Aus Abbildung 1 geht hervor, daß bei einer Reaktionszeit von 10 Minuten und einer Reaktionstemperatur von 37 °C ein gesicherter Linearitätsbereich bis etwa 6,5 mmol/l (etwa 20 mg/dl) besteht. Bei 25 °C und 30 °C beträgt der Linearitätsbereich infolge der Temperaturabhängigkeit der Reaktion nur etwa 3 mmol/l bzw. 4 mmol/l. Auch die Erhöhung der Reaktionszeit

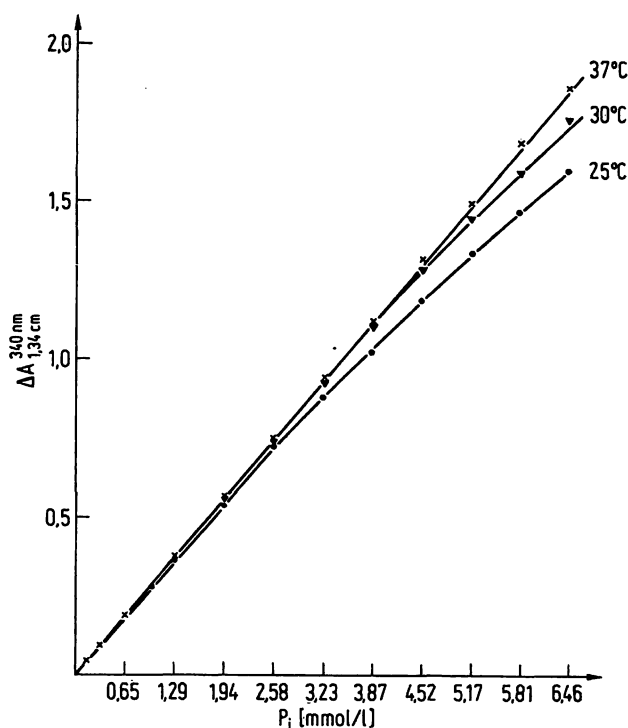


Abb. 1. Ermittlung des Linearitätsbereiches bei 25 °C (●), 30 °C (▲) und 37 °C (×).

Probenvolumen	5	μl
Diluentvolumen	30	μl
Reagenzvolumen	300	μl
Schichtdicke	1,34	cm
Wellenlänge	340	nm
Reaktionszeit	10	min

auf 20 Minuten brachte bei 25 °C und 30 °C Reaktionstemperatur keinen Linearitätsbereich bis 6,5 mmol/l wie bei 37 °C und 10 Minuten Reaktionszeit. Die Änderung des Reagenzvolumens von 300 auf 250 μl hatte nur einen sehr kleinen Effekt auf den Linearitätsbereich. Die direkte Messung des nicht reduzierten Phosphor-Molybdat-Komplexes kann im Bereich von 330 bis 350 nm vorgenommen werden. Die Spektren zeigen bei 315 nm ein steiles Maximum. Abbildung 2 kann ein Vergleich der Linearität und Empfindlichkeit der Messung bei 340 nm und 360 nm entnommen werden. Die Bestimmung wurde bei 25 °C durchgeführt. Da bei 320 nm die Eigenabsorption des Reagenzes für eine Schichtdicke von 1 cm (≈ 250 μl Reaktionsgemisch) schon bei 2,3 liegt, werden im oberen Linearitätsbereich der Bestimmung relativ hohe Absorptionen erhalten. Die bei 320 nm auftretenden hohen Absorptionen sind – neben dem Absorptionsanteil des Probenvolumens von 5 μl – dadurch bedingt, daß durch Einsatz von 300 μl Reagenz bei einem Endvolumen von 335 μl eine Schichtdicke von 1,3 cm resultiert. Da die Messung in longitudinal zum Strahlengang liegenden Küvetten erfolgt (8), werden höhere Anfangsabsorptionen erhalten. Normalerweise wird mit einer Schichtdicke von 1 cm gearbeitet. Deshalb wurden die weiteren Messungen bei 340 nm durchgeführt. Die Empfindlichkeit ist bei Messung mit dieser Wellenlänge etwa 0,290 Absorptionsdifferenz pro mmol/l Phosphat.

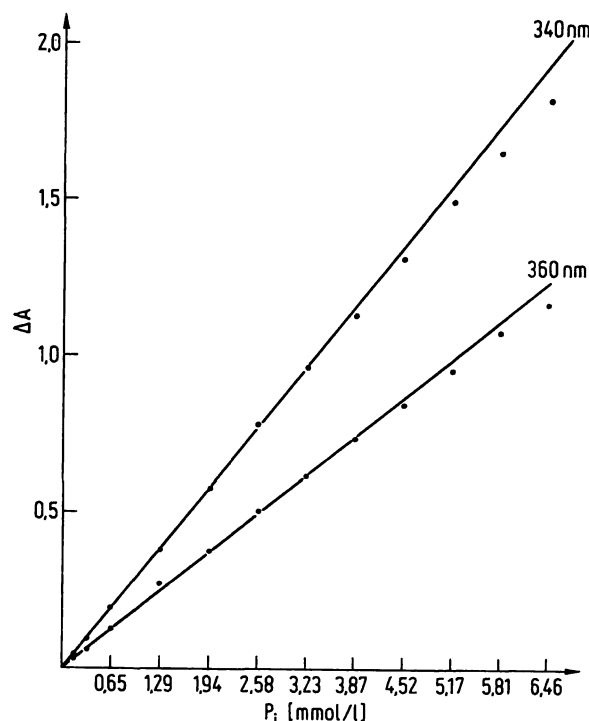


Abb. 2. Vergleich der Empfindlichkeit, wenn die Messung bei 340 nm bzw. 360 nm vorgenommen wird. Gleiche Testbedingungen wie bei Abbildung 1, jedoch Meßtemperatur 25 °C.

Farbentwicklung und Farbstabilität

Abbildung 3 und Abbildung 4 zeigen den Verlauf der Farbentwicklung in einer wäßrigen Verdünnungsreihe von

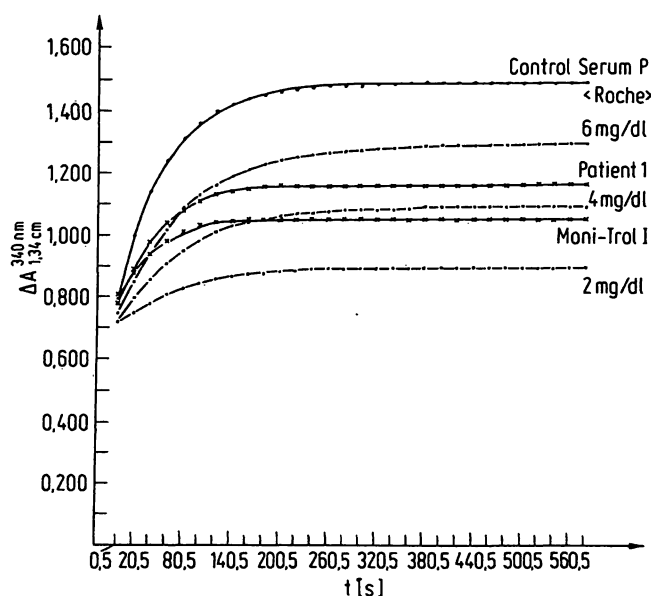


Abb. 3. Vergleich des Verlaufs der Farbentwicklung in einer wäßrigen Verdünnungsreihe mit der eines Kontrollserums humanen (Moni-Trol® I) und tierischen (Control Serum P <Roche>) Ursprungs sowie von Patientenscrum.

Probenvolumen	5	μl
Diluentvolumen	30	μl
Reagenzvolumen	300	μl
Schichtdicke	1,34	cm
Wellenlänge	340	nm
Reaktionstemperatur	37	°C
Die Absorptionen wurden von t_0 (= 0,5 s) bis 580 s im Abstand von 20 s aufgenommen.		

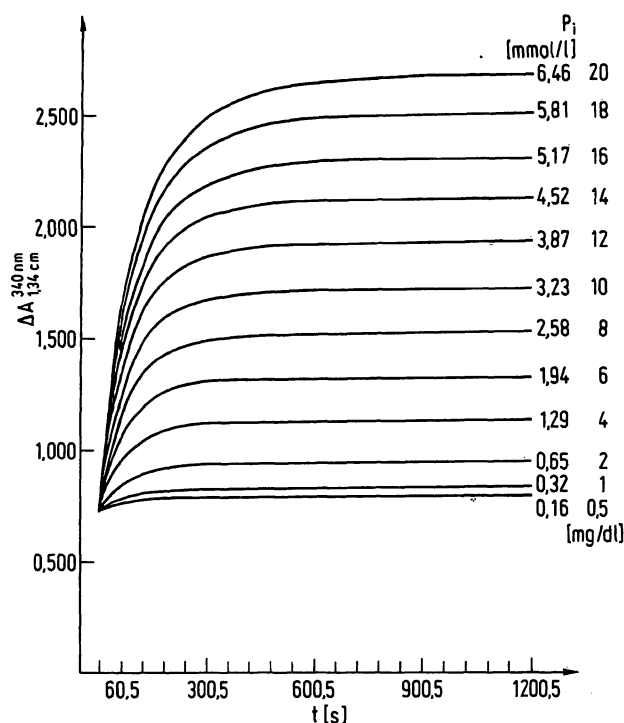


Abb. 4. Verlauf der Farbentwicklung in wässrigen Verdünnungsreihen von Phosphat. Die Phosphatkonzentrationen wurden von 0,2–6,5 mmol/l (0,5–20 mg/dl) variiert.
 Probenvolumen 5 μ l
 Diluentvolumen 30 μ l
 Reagenzvolumen 300 μ l
 Schichtdicke 1,34 cm
 Wellenlänge 340 nm
 Reaktionstemperatur 37 $^{\circ}$ C
 Die Absorptionen wurden während 20 min im Abstand von 1 min gemessen.

Phosphat und von Seren. Aus den Abbildungen und deren Vergleich ist zu ersehen, daß Reaktionsgemische, die Seren enthalten, schneller reagieren. Unter Zugrundelegung eines Linearitätsbereiches bis etwa 4 mmol/l ist auch bei wässrigen Lösungen eine Reaktionszeit von 10 Minuten ausreichend. Die Farbstabilität kann als ausreichend betrachtet werden.

Richtigkeitsüberprüfung mit Hilfe von Kontrollseren

Die Richtigkeit einer Bestimmung von anorganischem Phosphat in Serumproben ist nicht leicht zu beweisen, da es bislang noch keine empfohlene Referenzmethode gibt.

Eine erste Überprüfung der Richtigkeit wurde mit Hilfe von Kontrollseren durchgeführt und eine Vergleichsbetrachtung der erhaltenen Resultate mit den Deklarationswerten angestellt.

Tabelle 1 gibt eine Gegenüberstellung der erhaltenen Resultate und der nach verschiedenen Methoden deklarierten Werte. Unter Zugrundelegung der Malachitgrün-Methode, die ebenfalls ohne Enteiweißung arbeitet, werden bei allen Kontrollseren – innerhalb der allgemeinen Fehlergrenzen – entsprechende Werte gefunden. Die Werte sind im allgemeinen niedriger als diejenigen, die mit Hilfe einer Enteiweißungs-Methode deklariert wurden. Für die Richtigkeit der angewandten Methode spricht die recht gute Übereinstimmung zwischen den beiden sehr verschiedenen Nachweis-Verfahren: indirekte Malachitgrün-Molybdat-Methode und direkte Phosphor-Molybdat-Methode. Bei der ersten Methode setzt das Phosphat wahrscheinlich aus dem Malachitgrün-Molybdat-Komplex eine entsprechende Menge an Malachitgrün unter Bildung von Phosphor-Molybdat frei. Das freigesetzte Malachitgrün im Reaktionsgemisch wird photometrisch bei 578 nm gemessen. Bei der direkten Methode dagegen wird der gebildete, nicht reduzierte Phosphor-Molybdat-Komplex photometrisch bei 340 nm gemessen. Die Malachitgrün-Methode umgeht die Enteiweißung durch Zusatz von 6 mol/l Harnstoff, bei der direkten Phosphor-Molybdat-Methode wird Tween 80 zugesetzt.

Richtigkeitsüberprüfung durch Vergleichsuntersuchungen

Bei einem Vergleich der methodenabhängigen Deklarationen (Tabelle 1) für die verschiedenen Kontrollseren

Tab. 1. Gegenüberstellung der mit Kontrollseren erhaltenen Werte mit deren Deklarationen.

Kontrollserum	Angewandte Methode	Deklarationsbereich	Gefundener Wert
		(mmol/l)	
Validate-N 05 2708 7	Photometrie nach Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat und Reaktion mit Natriummolybdat. Eiweiß wird durch Carbonat/Sulfit gelöst. (Gomori, G. I. c. (9); Raabe, S. I. c. (10))	1,52 – 1,90 – 2,28	
	Photometrie nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure und Reaktion mit Ammoniummolybdat und -vanadat. (Zilversmit, D. B. & Davis, A. K. I. c. (11))	1,36 – 1,70 – 2,04	
	Photometrie nach Reaktion mit Malachitgrün in stark saurer Lösung. (Itaya, K. & Ui, M. I. c. (5))	1,15 – 1,44 – 1,73	1,38
	AutoAnalyzer® II	1,34 – 1,68 – 2,02	
	Photometrie nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure und Reaktion mit Ammoniummolybdat unter Zugabe von <i>p</i> -Semidin. (Kurzweg, G. & Massmann, W. I. c. (12))	1,52 – 1,90 – 2,28	
	Photometrie nach Reaktion mit Ammoniummolybdat	1,55 – 1,94 – 2,33	

Kontrollserum	Angewandte Methode	Deklarationsbereich	Gefundener Wert
		(mmol/l)	
Validate-A 04 33067 B	Photometrie nach Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat und Reaktion mit Natriummolybdat. Eiweiß wird durch Carbonat/Sulfit gelöst. (Gomori, G. l.c. (9); Raabe, S. l.c. (10))	1,90 – <u>2,40</u> – 2,90	1,98
	Photometrie nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure und Reaktion mit Ammoniummolybdat und -vanadat. (Zilversmit, D. B. & Davis, A. K. l.c. (11))	1,80 – <u>2,30</u> – 2,80	
	Photometrie und Reaktion mit Malachitgrün in stark saurer Lösung. (Itaya, K. & Ui, M. l.c. (5))	1,70 – <u>2,10</u> – 2,50	
	AutoAnalyzer® II	1,80 – <u>2,20</u> – 2,60	
	Photometrie nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure und Reaktion mit Ammoniummolybdat unter Zugabe von <i>p</i> -Semidin. (Kurzweg, G. & Massmann, W. l.c. (12))	1,80 – <u>2,30</u> – 2,80	
	Photometrie nach Reaktion mit Ammoniummolybdat	2,00 – <u>2,50</u> – 3,00	
Q-Pak I N05 A	Photometric method, after precipitation of proteins. Reaction with ammoniummolybdate and reduction to molybdenium blue	1,55 – <u>1,63</u> – 1,71	1,51
	Phosphomolybdic acid reduction with <i>p</i> -methylaminophenol sulphate, without deproteinisation	1,63 – <u>1,82</u> – 2,01	
	Molybdate vanadate	1,59 – <u>1,75</u> – 1,91	
	SMA-12/60	1,60 – <u>1,70</u> – 1,80	
	Phospho-molybdate-malachite green	1,30 – <u>1,60</u> – 1,90	
	Du Pont aca®	1,50 – <u>1,60</u> – 1,70	
	SMAC	1,30 – <u>1,50</u> – 1,70	
	AutoAnalyzer® I	1,50 – <u>1,72</u> – 1,94	
	AutoAnalyzer® II, SMA System	1,46 – <u>1,68</u> – 1,90	
	Colorimetric, manual	1,40 – <u>1,74</u> – 2,08	
Q-Pak II P11	Vickers M300/D300	1,41 – <u>1,75</u> – 2,09	2,59
	Photometric method, after precipitation of proteins. Reaction with ammoniummolybdate and reduction to molybdenium blue	2,40 – <u>2,80</u> – 3,20	
	Phosphomolybdic acid reduction with <i>p</i> -methylaminophenol sulphate, without deproteinisation	2,40 – <u>2,90</u> – 3,40	
	Phospho-molybdate-malachite green complex	–	
	SMA-12/60	<u>2,80</u>	
	AutoAnalyzer® (N-4c)	2,80 – <u>3,00</u> – 3,20	
	American Monitor	–	
	SMAC	2,50 – <u>2,70</u> – 2,90	
	AutoAnalyzer® I	2,21 – <u>2,80</u> – 3,39	
	AutoAnalyzer® II, SMA System	2,49 – <u>2,81</u> – 3,13	
Moni-Trol® I-E LTD-153A	Colorimetric, manual	2,36 – <u>2,82</u> – 3,28	0,98
	Vickers M300/D300	2,64 – <u>2,94</u> – 3,24	
	Ammoniummolybdat-Reaktion nach Enteiweißung. Reduktion zu Molybdänblau. Standard: Merck 4873	1,07 – <u>1,15</u> – 1,23	
	Reaktion mit Ammoniummolybdat und -vanadat, mit Enteiweißung (Boehringer-Mannheim)	1,08 – <u>1,19</u> – 1,30	
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, mit Enteiweißung (Merck)	1,03 – <u>1,13</u> – 1,23	
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, ohne Enteiweißung (Merck)	1,23 – <u>1,34</u> – 1,45	
	Malachitgrün-Reaktion, ohne Enteiweißung (Roche)	0,84 – <u>0,97</u> – 1,10	
	Molybdänblau-Reaktion nach Fiske & Subbarow, l.c. (13), modifiziert (Harleco)	1,42 – <u>1,55</u> – 1,68	
Moni-Trol® II PTD-58A	Ammoniummolybdat-Reaktion nach Enteiweißung. Reduktion zu Molybdänblau. Standard: Merck 4873	1,61 – <u>1,71</u> – 1,81	
	Reaktion mit Ammoniummolybdat und -vanadat, mit Enteiweißung (Boehringer-Mannheim)	1,66 – <u>1,81</u> – 1,96	

Kontrollserum	Angewandte Methode	Deklarationsbereich (mmol/l)	Gefundener Wert (mmol/l)
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, mit Enteiweißung (Merck)	1,57 – <u>1,71</u> – 1,85	1,49
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, ohne Enteiweißung (Merck)	1,77 – <u>1,94</u> – 2,11	
	Malachitgrün-Reaktion, ohne Enteiweißung (Roche)	1,39 – <u>1,55</u> – 1,71	
	Molybdänblau-Reaktion nach <i>Fiske & Subbarow</i> , l.c. (13), modifiziert (Harleco)	1,97 – <u>2,18</u> – 2,39	
Control Serum N (Roche) A2137	Molybdenum Blue, with deproteinization	0,99 – <u>1,10</u> – 1,21	
	Molybdenum Blue, AutoAnalyzer® I, II, SMA	0,86 – <u>1,00</u> – 1,15	0,91
	Malachite Green, without deproteinization	0,73 – <u>0,82</u> – 0,92	
Control Serum P (Roche) A0438	Molybdenum Blue, with deproteinization	2,39 – <u>2,68</u> – 2,97	
	Molybdenum Blue, AutoAnalyzer® I, II, SMA	2,23 – <u>2,49</u> – 2,74	2,42
	Malachite Green, without deproteinization	2,13 – <u>2,32</u> – 2,57	
Lab-Trol® LT-48A	Ammoniummolybdat-Reaktion nach Enteiweißung. Reduktion zu Molybdänblau. Standard: Merck 4873	0,77 – <u>0,90</u> – 1,03	
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, ohne Enteiweißung (Merck)	0,83 – <u>0,91</u> – 0,99	
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, mit Enteiweißung (Merck)	0,87 – <u>0,97</u> – 1,07	
	Reaktion mit Ammoniummolybdat und -vanadat, mit Enteiweißung (Boehringer-Mannheim)	0,93 – <u>1,04</u> – 1,15	0,88
	Molybdänblau-Reaktion nach <i>Fiske & Subbarow</i> , l.c. (13), (Harleco)	0,89 – <u>0,99</u> – 1,09	
	AutoAnalyzer® I	0,87 – <u>0,97</u> – 1,07	
	AutoAnalyzer® II	0,88 – <u>0,97</u> – 1,06	
	Malachitgrün-Reaktion, ohne Enteiweißung (Roche)	0,66 – <u>0,73</u> – 0,79	
Patho-Trol® 75C	Ammoniummolybdat-Reaktion nach Enteiweißung. Reduktion zu Molybdänblau. Standard: Merck 4873	1,77 – <u>1,90</u> – 2,03	
	Reaktion mit Ammoniummolybdat und -vanadat, mit Enteiweißung (Boehringer-Mannheim)	1,85 – <u>2,01</u> – 2,17	
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, mit Enteiweißung (Merck)	1,74 – <u>1,90</u> – 2,06	1,82
	Phosphormolybdat-Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat, ohne Enteiweißung (Merck)	1,76 – <u>1,92</u> – 2,08	
	Malachitgrün-Reaktion, ohne Enteiweißung (Roche)	1,68 – <u>1,84</u> – 2,00	
	Molybdänblau-Reaktion nach <i>Fiske & Subbarow</i> , l.c. (13), (Harleco)	1,73 – <u>1,92</u> – 2,11	
	AutoAnalyzer® II (04) <i>Fiske & Subbarow</i> , l.c. (13), modifiziert	1,77 – <u>1,90</u> – 2,03	
Precinorm® U 720	Molybdat/Vanadat, nach Enteiweißung	1,01 – <u>1,12</u> – 1,23	
	Molybdänblau, ohne Enteiweißung (Merck)	1,08 – <u>1,26</u> – 1,44	
	Molybdänblau, ohne Enteiweißung (Harleco)	1,29 – <u>1,43</u> – 1,57	0,89
Precinorm® U 720	Molybdänblau/Malachitgrün, ohne Enteiweißung	0,79 – <u>0,94</u> – 1,09	0,89
	Molybdänblau, SMA + AutoAnalyzer® II	0,95 – <u>1,06</u> – 1,17	
Seronorm 128	AutoAnalyzer® nach Reaktion mit Ammoniummolybdat und Reduktion mit Aminonaphthol-sulfonsäure, Technicon Method N-4b. (<i>Fiske, C. H. & Subbarow, Y. l.c.</i> (13))	1,23 – <u>1,31</u> – 1,39	
	Photometrisch nach Proteinfällung. Reaktion mit Ammoniummolybdat und Reduktion mit Eisen(II)chlorid. (<i>Goldenberg, H. & Fernandez, A. l.c.</i> (14))	1,23 – <u>1,33</u> – 1,43	
	Photometrisch nach Proteinfällung. Reaktion mit Ammoniummolybdat und Reduktion mit Amidol. (<i>Büttner, H.: Persönliche Mitteilung, Müller, E. l.c.</i> (15))	1,20 – <u>1,28</u> – 1,36	1,21
	Analysenautomat Perkin-Elmer C4 nach Enteiweißung mit Trichlor-essigsäure und Reduktion mit <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat. (<i>Gomori, G. l.c.</i> (16))	1,20 – <u>1,29</u> – 1,38	

ist zu erwarten, daß auch die Werte in Patientenserien je nach angewandter Methode systematisch – und wahrscheinlich auch serumspezifisch – voneinander abweichen werden. Um die erhaltenen Resultate besser inter-

pretieren und werten zu können, wurden deshalb gleichzeitig in 40 bis 60 Seren der anorganische Phosphor nach verschiedenen manuellen Methoden und Techniken bestimmt. Die Abbildungen 5a, 5b, 5c und 5d zeigen eine

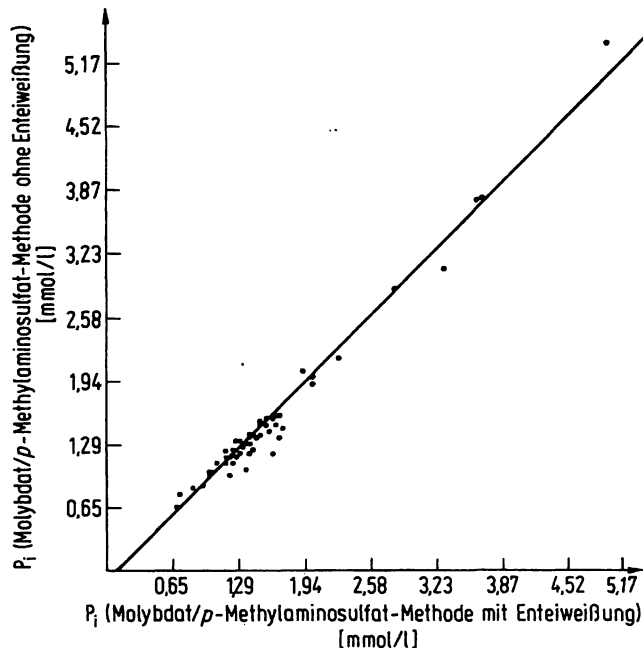


Abb. 5a. Vergleichsuntersuchung zwischen der Molybdat/*p*-Methylaminosulfat-Methode mit (x) und ohne (y) vorhergehende Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

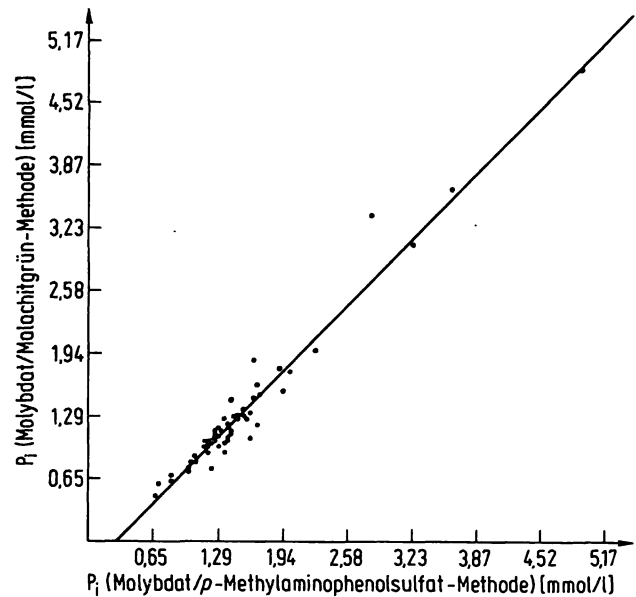


Abb. 5c. Vergleichsuntersuchungen zwischen der Molybdat/*p*-Methylaminophenolsulfat-Methode (x) und der Molybdat/Malachitgrün-Methode (y). Beide Verfahren wurden ohne Enteiweißung durchgeführt.

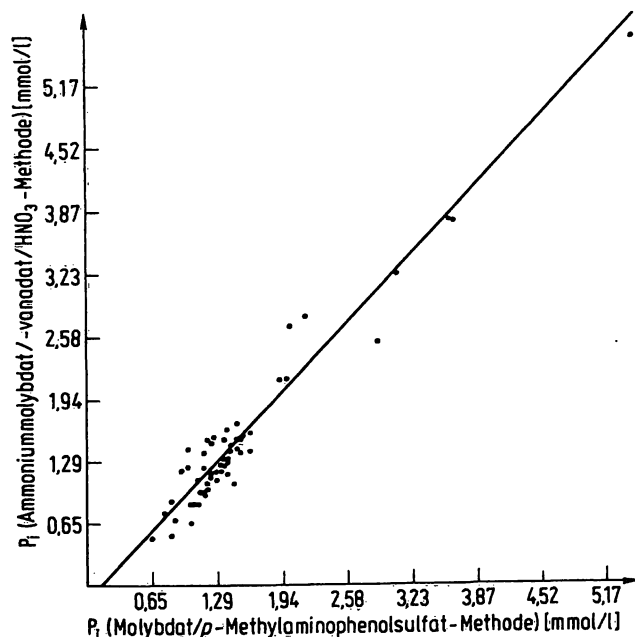


Abb. 5b. Vergleichsuntersuchungen zwischen der Molybdat/*p*-Methylaminophenolsulfat-Methode (x) und der Ammoniummolybdat/Ammoniumvanadat/ HNO_3 -Methode (y). Beide Verfahren wurden mit Enteiweißung durchgeführt.

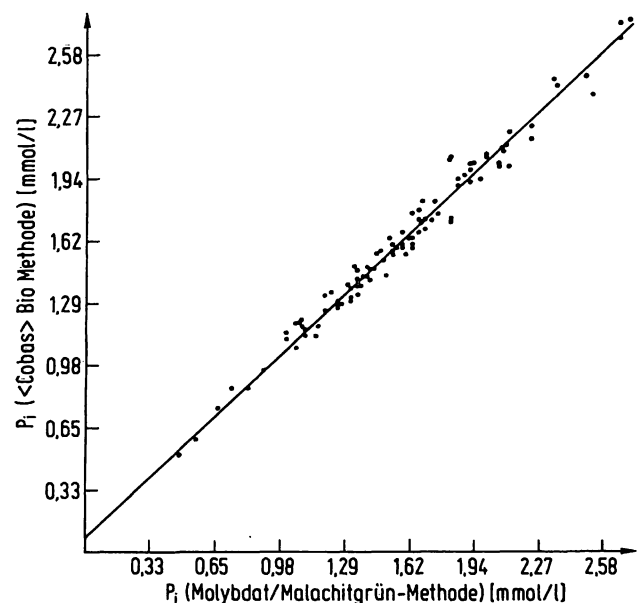


Abb. 5d. Vergleichsuntersuchungen zwischen der Molybdat/Malachitgrün-Methode (x) und der (Cobas) Bio Methode (y).

Tab. 2. Vergleich von verschiedenen Methoden (Zusammenfassung).

Methode	Ent-eiwei- sung	Abbil- dung	Anzahl Paare	Mittelwert mmol/l	Korrelations- koeffizient r	Parameter der Regressionsgeraden	
						Stei- gung b	Achsen- abschnitt mmol/l a
x: Molybdat/p-Methylaminophenolsulfat	+	5a	59	1,471	0,9849	1,058	- 0,146
y: Molybdat/p-Methylaminophenolsulfat	-			1,410			
x: Molybdat/p-Methylaminophenolsulfat	+	5b	57	1,418	0,9609	1,129	- 0,189
y: Ammoniummolybdat/Ammoniumvanadat/HNO ₃	+			1,412			
x: Molybdat/p-Methylaminophenolsulfat	-	5c	59	1,471	0,9768	1,058	- 0,311
y: Malachitgrün/Molybdat	-			1,245			
x: Molybdat/Malachitgrün	-	5d	99	1,618	0,9917	0,966	+ 0,075
y: (Cobas) Bio (direkte Molybdat-Methode)	-			1,637			

Gegenüberstellung der Werte. Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der entsprechenden statistischen Daten.

Einfluß der Enteiweißung auf die Bestimmung des anorganischen Phosphors

Um Klarheit darüber zu erhalten, ob die unterschiedlichen Werte durch die Methoden oder durch die Enteiweißung bedingt sind, wurde neben der direkten Methode noch die Malachitgrün-Methode mit zwei verschiedenen Enteiweißungsverfahren untersucht.

In 12 verschiedenen Kontrollseren unterschiedlichen Ursprungs und von verschiedenen Herstellern erfolgte die Bestimmung des anorganischen Phosphors sowohl ohne als auch nach Enteiweißung mit zwei verschiedenen Verfahren. Zum Vergleich der Werte wurde zusätzlich noch die Konzentration an anorganischem Phosphor mit der Molybdat/p-Methylaminophenolsulfat- und der Molybdat/Vanadat-Methode bestimmt. Tabelle 3a zeigt eine Gegenüberstellung der Werte. Folgende Ergebnisse der manuell durchgeführten Bestimmungen sind ersicht-

Tab. 3a. Gegenüberstellung der nach verschiedenen Methoden und Enteiweißungsverfahren erhaltenen Werte (mmol/l) bei Kontrollseren.

Kontrollserum	Direkte Malachit- grün- Methode	Malachit- grün- Methode mit Ent- eiweißung:	Malachit- grün- Methode mit Ent- eiweißung:	Molybdat/ p-Methyl- aminosulfat- Methode mit Ent- eiweißung:	Molybdat/ p-Methyl- aminosulfat- Methode ohne Ent- eiweißung:	Molybdat/ Vanadat- Methode mit Ent- eiweißung:
		0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichlor- essigsäure	0,1 ml Probe + 1,0 ml Trichlor- essigsäure	0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichlor- essigsäure		0,1 ml Probe + 1,0 ml Trichlor- essigsäure
Lab-Trol® LT-48 A-H	0,73	0,91	0,99	0,97	0,82	0,89
Patho-Trol® PT-70	1,81	1,93	2,09	1,92	1,75	1,90
Moni-Trol® I LTD-153A	0,93	1,09	1,20	1,09	1,28	1,11
Moni-Trol® II PTD-58A	1,54	—	—	1,70	1,87	1,76
Moni-Trol® II PTD-60A	1,90	2,06	2,13	1,81	—	2,09
Q-PAK I N05	1,11	—	—	1,25	1,37	1,30
Q-PAK II P11	2,72	2,91	2,90	2,66	2,91	3,05
Validate-A 0433067B	2,07	2,23	2,36	2,10	2,47	2,25
Validate-N 0527087	1,39	1,59	1,74	1,57	—	1,63
Control Serum N (Roche) A2137	0,79	0,93	1,16	1,36	—	0,89
Control Serum P (Roche) A0438	1,80	2,06	2,04	2,19	2,10	2,05
Precilip® 665	1,18	1,37	1,48	1,51	1,23	1,41
Precinorm® U 727	0,86	1,00	1,16	1,28	—	1,00

lich: die direkt durchgeführte Malachitgrün-Methode liefert bei Kontrollseren durchwegs niedrigere Werte. Wenn eine Enteiweißung durchgeführt wird, sind die Werte bei einer Enteiweißung mit 0,1 ml Probe + 1 ml Trichloressigsäure höher als bei einer Enteiweißung mit 0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichloressigsäure. Die mit der Molybdat/*p*-Methylaminophenolsulfat- und der Molybdat/Vanadat-Methode gefundenen Werte gruppierten sich zwischen die beiden durchgeführten Enteiweißungs-Methoden bei der Malachitgrün-Methode und zeigen innerhalb der allgemeinen Fehlergrenzen und den Deklarationsbreiten bei den Kontrollseren kein eindeutiges Verhalten. Tabelle 3b gibt eine Zusammenfassung der entsprechenden statistischen Daten.

Ein Vergleich von Tabelle 2 mit dem Korrelationsdiagramm für 12 Kontrollseren in Tabelle 3b zeigt, daß nicht unbedingt die gleichen Schlußfolgerungen für das Verhalten zwischen Kontrollseren und Patientenseren bei der Bestimmung des anorganischen Phosphors gelten.

Richtigkeitsüberprüfung durch Recovery-Untersuchungen

Die Recovery-Untersuchungen wurden sowohl in Serumgemischen als auch nach Zusatz von wäßrigen Standardlösungen durchgeführt.

Tab. 3b. Korrelationsdiagramm über die nach verschiedenen Verfahren ermittelten Konzentrationen (mmol/l) an anorganischem Phosphor.

y	Direkte Malachitgrün-Methode	Malachitgrün-Methode mit Enteiweißung:	Malachitgrün-Methode mit Enteiweißung:	Molybdat/ <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat-Methode mit Enteiweißung:	Molybdat/ <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat-Methode ohne Enteiweißung:	Molybdat/Vanadat-Methode mit Enteiweißung:
x		0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichloressigsäure	0,1 ml Probe + 1,0 ml Trichloressigsäure	0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichloressigsäure		0,1 ml Probe + 1,0 ml Trichloressigsäure
direkte Malachitgrün-Methode		n = 11 $\bar{x} = 1,471$ $\bar{y} = 1,644$ $r = 0,998$ $y = 0,150 + 1,015x$	n = 11 $\bar{x} = 1,471$ $\bar{y} = 1,750$ $r = 0,998$ $y = 0,354 + 0,949x$	n = 13 $\bar{x} = 1,448$ $\bar{y} = 1,647$ $r = 0,958$ $y = 0,479 + 0,807x$	n = 9 $\bar{x} = 1,543$ $\bar{y} = 1,756$ $r = 0,972$ $y = 0,128 + 1,055x$	n = 13 $\bar{x} = 1,448$ $\bar{y} = 1,641$ $r = 0,996$ $y = 0,097 + 1,066x$
Malachitgrün-Methode mit Enteiweißung: 0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichloressigsäure	n = 11 $\bar{x} = 1,644$ $\bar{y} = 1,471$ $r = 0,998$ $y = -0,148 + 0,985x$		n = 11 $\bar{x} = 1,644$ $\bar{y} = 1,750$ $r = 0,995$ $y = 0,214 + 0,934x$	n = 11 $\bar{x} = 1,644$ $\bar{y} = 1,678$ $r = 0,963$ $y = 0,393 + 0,782x$	n = 7 $\bar{x} = 1,786$ $\bar{y} = 1,794$ $r = 0,977$ $y = -0,095 + 1,058x$	n = 11 $\bar{x} = 1,644$ $\bar{y} = 1,661$ $r = 0,999$ $y = -0,066 + 1,051x$
Malachitgrün-Methode mit Enteiweißung: 0,1 ml Probe + 1,0 ml Trichloressigsäure	n = 11 $\bar{x} = 1,750$ $\bar{y} = 1,471$ $r = 0,998$ $y = -0,374 + 1,054x$	n = 11 $\bar{x} = 1,750$ $\bar{y} = 1,644$ $r = 0,995$ $y = -0,229 + 1,070x$		n = 11 $\bar{x} = 1,750$ $\bar{y} = 1,678$ $r = 0,963$ $y = 0,211 + 0,839x$	n = 7 $\bar{x} = 1,866$ $\bar{y} = 1,794$ $r = 0,973$ $y = -0,263 + 1,102x$	n = 11 $\bar{x} = 1,750$ $\bar{y} = 1,661$ $r = 0,993$ $y = -0,308 + 1,125x$
Molybdat/ <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat-Methode mit Enteiweißung: 0,5 ml Probe + 0,5 ml Trichloressigsäure	n = 13 $\bar{x} = 1,647$ $\bar{y} = 1,448$ $r = 0,958$ $y = -0,953 + 1,240x$	n = 11 $\bar{x} = 1,678$ $\bar{y} = 1,644$ $r = 0,963$ $y = -0,503 + 1,279x$	n = 11 $\bar{x} = 1,678$ $\bar{y} = 1,750$ $r = 0,963$ $y = -0,251 + 1,192x$		n = 9 $\bar{x} = 1,710$ $\bar{y} = 1,756$ $r = 0,947$ $y = -0,282 + 1,191x$	n = 13 $\bar{x} = 1,647$ $\bar{y} = 1,641$ $r = 0,955$ $y = -0,543 + 1,326x$
Molybdat/ <i>p</i> -Methylaminophenolsulfat-Methode ohne Enteiweißung	n = 9 $\bar{x} = 1,756$ $\bar{y} = 1,543$ $r = 0,972$ $y = -0,121 + 0,948x$	n = 7 $\bar{x} = 1,794$ $\bar{y} = 1,786$ $r = 0,977$ $y = 0,090 + 0,945x$	n = 7 $\bar{x} = 1,794$ $\bar{y} = 1,866$ $r = 0,973$ $y = 0,238 + 0,907x$	n = 9 $\bar{x} = 1,756$ $\bar{y} = 1,710$ $r = 0,947$ $y = 0,236 + 0,839x$		n = 9 $\bar{x} = 1,756$ $\bar{y} = 1,747$ $r = 0,975$ $y = -0,014 + 1,003x$
Molybdat/Vanadat-Methode mit Enteiweißung: 0,1 ml Probe + 1,0 ml Trichloressigsäure	n = 13 $\bar{x} = 1,641$ $\bar{y} = 1,448$ $r = 0,996$ $y = -0,091 + 0,938x$	n = 11 $\bar{x} = 1,661$ $\bar{y} = 1,644$ $r = 0,999$ $y = 0,063 + 0,952x$	n = 11 $\bar{x} = 1,661$ $\bar{y} = 1,750$ $r = 0,993$ $y = 0,274 + 0,889x$	n = 13 $\bar{x} = 1,641$ $\bar{y} = 1,647$ $r = 0,955$ $y = 0,409 + 0,754x$	n = 9 $\bar{x} = 1,747$ $\bar{y} = 1,756$ $r = 0,975$ $y = 0,014 + 0,997x$	

Recovery 1

4 Seren mit unterschiedlichem Gehalt an Phosphat (eventuell nach Aufstockung) wurden untereinander im Verhältnis 1:1 gemischt. Tabelle 4 zeigt, daß die Wiederfindung zwischen 99,4 und 103,7% lag (Mittelwert 101,6%).

Tab. 4. Wiederfindungsversuche 1:
Mischung von Seren untereinander.

	Gefundener Wert (mmol/l)	Theoretischer Wert (mmol/l)	Wiederfindung (%)
Serum A	0,67		
Serum B	1,24		
Serum C	1,76		
Serum D	2,62		
1 Vol. A + 1 Vol. B	0,99	0,96	103,1
1 Vol. A + 1 Vol. C	1,22	1,21	100,8
1 Vol. A + 1 Vol. D	1,66	1,67	99,4
1 Vol. B + 1 Vol. C	1,51	1,50	100,6
1 Vol. B + 1 Vol. D	1,98	1,93	102,6
1 Vol. C + 1 Vol. D	2,27	2,19	103,7
$\bar{x} = 101,7$			

Recovery 2

Zu jeweils 2 ml Serum wurden 20 µl einer wäßrigen Lösung an Phosphat zugesetzt und die Bestimmung durchgeführt. Nach Tabelle 5 ist die Wiederfindung 99,1% (Bereich 93,5% bis 105,7%).

Tab. 5. Wiederfindungsversuche 2:
Zusatz von wäßriger Phosphat-Lösung zum Serum.

	Gefundener Wert (mmol/l)	Theoretischer Wert (mmol/l)	Wiederfindung (%)
Serum A normal	0,83		
A + 0,32 mmol/l	1,11	1,05	105,7
A + 0,65 mmol/l	1,36	1,35	100,7
A + 0,97 mmol/l	1,58	1,62	97,5
A + 1,29 mmol/l	1,82	1,92	94,8
A + 1,61 mmol/l	2,29	2,19	104,6
A + 1,94 mmol/l	2,41	2,54	94,9
A + 2,26 mmol/l	2,67	2,73	97,8
A + 2,58 mmol/l	2,87	3,07	93,5
A + 2,91 mmol/l	3,25	3,27	99,4
A + 3,23 mmol/l	3,51	3,44	102,0
$\bar{x} = 99,1$			

Recovery 3

8 Kontrollseren wurden sowohl in Wasser als auch in wäßrigen Lösungen von Phosphat aufgelöst. Gemäß Tabelle 6 ist – unter Berücksichtigung des Eigenvolumens der Kontrollseren – eine Recovery zwischen 94,2% und 100% ersichtlich (Mittelwert 97%).

Tab. 6. Wiederfindungsversuche 3:
Auflösung von Kontrollseren in wäßrigen Lösungen.

Kontrollserum	Gefunde- ner Wert mmol/l	Theore- tischer Wert mmol/l	Wieder- findung %	%
Moni-Trol® I				
in Wasser	0,86			
in 0,65 mmol/l	1,45	1,48	97,97	97,3
in 1,29 mmol/l	2,00	2,10	95,24	
in 2,58 mmol/l	3,30	3,34	98,80	
Hyland® II				
in Wasser	2,62			
in 0,65 mmol/l	3,28	3,23	101,55	98,4
in 1,29 mmol/l	3,83	3,85	99,48	
in 2,58 mmol/l	4,79	5,08	94,29	
Control Serum N (Roche) (A2941)				
in Wasser	0,95			
in 0,65 mmol/l	1,57	1,56	100,64	100
in 1,29 mmol/l	2,21	2,16	102,31	
in 2,58 mmol/l	3,28	3,38	97,04	
Control Serum P (Roche) (A0438)				
in Wasser	2,55			
in 0,65 mmol/l	3,11	3,16	98,42	98,0
in 1,29 mmol/l	3,74	3,77	99,20	
in 2,58 mmol/l	4,81	4,99	96,39	
Validate-A				
in Wasser	2,07			
in 0,65 mmol/l	2,60	2,69	96,69	95,7
in 1,29 mmol/l	3,16	3,32	95,18	
in 2,58 mmol/l	4,34	4,56	95,18	
Validate-N				
in Wasser	1,45			
in 0,65 mmol/l	2,01	2,07	97,10	96,7
in 1,29 mmol/l	2,63	2,69	97,77	
in 2,58 mmol/l	3,74	3,93	95,17	
Moni-Trol® II				
in Wasser	1,77			
in 0,65 mmol/l	2,27	2,39	94,98	94,2
in 1,29 mmol/l	2,89	3,02	95,70	
in 2,58 mmol/l	3,92	4,26	92,02	
Precinorm® U				
in Wasser	0,87			
in 0,65 mmol/l	1,43	1,49	95,97	96,7
in 1,29 mmol/l	2,07	2,11	98,10	
in 2,58 mmol/l	3,22	3,35	96,12	
				% = 97

Matrix-Effekte

Um Aussagen über Matrixeffekte zu erhalten, wurden zu jeweils 500 µl Serum (Nr. 1, 2, 3, 4, 5 und 6) bzw. 500 µl Wasser je 10 µl einer wäßrigen Verdünnungsreihe von Phosphat zugesetzt und die Steigungen miteinander verglichen. Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, verlaufen die Geraden nahezu – jedoch nicht ganz streng – parallel mit der Geraden für die wäßrige Verdünnungsreihe.

Abbildung 6 und Tabelle 7 zeigen einen Vergleich der gefundenen mit den berechneten Geraden. Die Steigungen schwanken zwischen 0,876 und 1,009. Um abzuklären, ob dies systembedingt ist oder auch bei anderen Bestimmungen in gleicher Größenordnung auftritt, wurden die gleichen Versuche zur Aufdeckung von Matrixeffekten bei zwei anderen Bestimmungen (Glucose und Harnstoff) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden sowohl zu je 500 µl Seren 1, 2, 3, 4, 5 und 6 als auch zu 500 µl Wasser 10 µl einer Verdünnungsreihe von Glucose bzw. Harnstoff zugesetzt. Weiterhin wurden die 6 Seren ohne Zusatz analysiert. Für die Glucose-Bestimmung wurde die Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode (Autoblocking-Methode mit Berücksichtigung des Proben-Leerwertes) und für die Harnstoff-Bestimmung die Urease/Glutamatdehydrogenase-Methode (Initial Rate Verfahren) verwendet. Aus Tabelle 7 geht ein Vergleich der gefundenen Recovery-Werte, der Regressionsgeraden — berechnet mit x-Werten: 500 µl H₂O + 10 µl Verdünnungsreihe, y-Werte: 500 µl Serum + 10 µl Verdünnungsreihe —, der berechneten a-Werte (= Schnittpunkt mit y-Achse = errechneter Wert für Serum ohne Zusatz) und der gefundenen b-Werte sowie der Korrelationskoeffizienten hervor. Auch bei diesen Bestimmungen wurde keine ganz strenge Parallelität gefunden (Steigungen b).

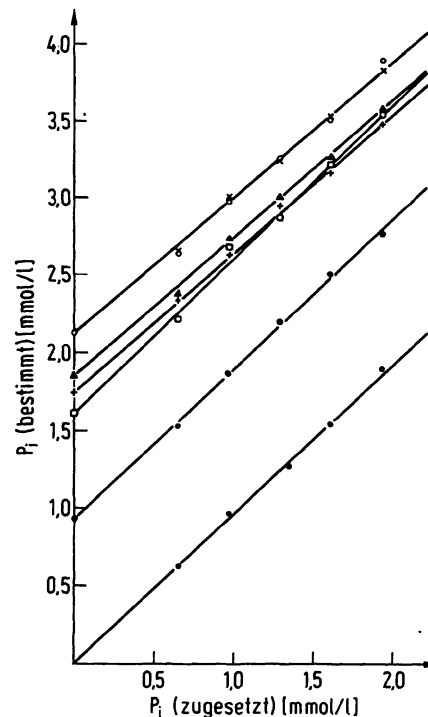


Abb. 6. Untersuchung der Bestimmung auf mögliche Matrixeffekte. Zu jeweils 500 µl Serum bzw. 500 µl Wasser wurden 10 µl einer konzentrierten Verdünnungsreihe von Phosphat zugesetzt. Die Geraden wurden 'bestmöglichst' eingezeichnet. Schnitt mit y-Achse: kein Zusatz von Phosphat.

• Serum 1 x Serum 2 o Serum 3
▲ Serum 4 + Serum 5 ■ Serum 6

Tab. 7. Vergleich der Recovery-Versuche bei der Bestimmung von anorganischem Phosphor (direkte Molybdat-Methode), von Glucose (Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode) und Harnstoff (Urease/Glutamatdehydrogenase-Methode). Zu je 500 µl Serum (Nr. 1–6) wurden 10 µl einer konzentrierten Verdünnungsreihe (5 Punkte), die anorganisches Phosphat, Glucose und Harnstoff enthält, zugegeben. Gleiches Vorgehen mit 500 µl Wasser. Berechnung der Recovery, der Regressionsgeraden, Steigungen und Vergleich der gefundenen Werte (a_{gefunden}) mit den berechneten Werten für Seren ohne Zusatz.

	Anorganischer Phosphor				Glucose				Harnstoff			
	Recovery (%)	$y = a + bx$	r	$a_{\text{gef.}}$	Recovery (%)	$y = a + bx$	r	$a_{\text{gef.}}$	Recovery (%)	$y = a + bx$	r	$a_{\text{gef.}}$
Serum 1	100,9	$y = 0,923 + 0,962x$	0,9988	0,91	99,3	$y = 3,70 + 0,906x$	0,9987	3,58	101,1	$y = 4,21 + 0,966x$	0,997	4,01
Serum 2	97,9	$y = 2,113 + 0,879x$	0,9982	2,08	98,8	$y = 4,70 + 0,892x$	0,9989	4,55	97,3	$y = 15,17 + 0,839x$	0,9977	14,59
Serum 3	97,9	$y = 2,024 + 0,957x$	0,9996	2,08	99,3	$y = 4,80 + 0,947x$	0,9998	4,71	97,2	$y = 27,23 + 0,720x$	0,9938	25,37
Serum 4	98,4	$y = 1,812 + 0,916x$	0,9985	1,81	99,9	$y = 5,15 + 0,954x$	0,9999	5,19	95,1	$y = 18,11 + 0,783x$	0,9971	17,53
Serum 5	98,7	$y = 1,779 + 0,876x$	0,9983	1,71	99,6	$y = 4,32 + 0,917x$	0,9990	4,41	99,1	$y = 15,15 + 0,865x$	0,9985	14,74
Serum 6	98,8	$y = 1,580 + 1,009x$	0,9993	1,58	99,4	$y = 6,29 + 0,921x$	0,9993	6,24	99,6	$y = 11,04 + 0,945x$	0,9988	10,68

Reproduzierbarkeit

Die Präzision der Bestimmung des anorganischen Phosphors auf dem (Cobas) Bio wurde sowohl in der Serie als auch von Tag zu Tag untersucht. Tabelle 8a zeigt die Daten für die Präzision in der Serie. Die Variationskoeffizienten liegen unter 2%. Aussagen über die Präzision von Tag zu Tag konnten bei der Ermittlung von Sollwerten in Kontrollseren erhalten werden (Tab. 8b). Bei der Ermittlung des Variationskoeffizienten wurde jeweils der 1. Wert der Berechnung verwendet. Die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag liegen zwischen 2 und 4%.

Tab. 8a. Präzision im Lauf (direkte Molybdat-Methode)

Probe		Mittelwert (mmol/l)	Standardabweichung (mmol/l)	Variationskoeffizient (%)
Moni-Trol® I LTD-153A	1. Lauf	1,016	0,016	1,57
	2. Lauf	1,012	0,014	1,38
Control Serum P (Roche) A0438	1. Lauf	2,589	0,041	1,58
	2. Lauf	2,503	0,030	1,20

Tab. 8b. Präzision von Tag zu Tag (direkte Molybdat-Methode)
n = 10 Tage, jeweils 1. Wert, 2 Bearbeiter, 4 verschiedene Geräte.

Probe	Mittelwert (mmol/l)	Standardabweichung (mmol/l)	Variationskoeffizient (%)
Precinorm® U 713	0,940	0,041	4,36
Control Serum P (Roche) A0438	2,470	0,046	1,87
Control Serum P (Roche) N2233	2,44	0,069	2,83
Control Serum N (Roche) N2832	1,23	0,040	3,25

Diskussion

Aus unseren Befunden ist ersichtlich, daß die direkte Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphors auf dem (Cobas) Bio eine sehr brauchbare Alternative zu den bisherigen in der Routine eingesetzten Verfahren ist. Da die Bestimmung ohne Enteiweißung arbeitet, ist sie auf vielen Analysenautomaten einsetzbar. Es wird allerdings wiederum – wie bei allen anderen nichtenzymatischen Verfahren – in stark saurem Milieu gearbeitet.

Literatur

- Weissmann, N. & Pileggi, V. J. (1974) Inorganic Ions, Determination of Inorganic Phosphorus, In: Clinical Chemistry, Principles and Techniques (Henry, R. J., Cannon, D. C. & Winkelman, J. W., eds.) 2. Auflage, pp. 721–754, Harper + Row, Hagerstown/Md.
- Schulz, D. W., Passonneau, J. V. & Lowry, O. H. (1967) Anal. Biochem. 19, 300–314.
- Fawaz, E. N. & Tejiran, A. (1972) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 215–219.
- Scopes, R. K. (1972) Anal. Biochem. 47, 88–94.
- Itaya, K. & Ui, M. (1966) Clin. Chim. Acta 14, 361–363.
- Daly, J. A. & Ertlinghausen, G. (1972) Clin. Chem. 18, 263–265.
- Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Dtsch. Lebensm. Rundsch. 77, 1–26.
- Eisenwiener, H. G. & Keller, M. (1979) Clin. Chem. 25, 117–121.
- Gomori, G. (1942) J. Lab. Clin. Med. 27, 955–961.
- Raabe, S. (1955) Rec. Trav. Chim. Pays Bas 74, 652–660.
- Zilversmit, D. B. & Davis, A. K. (1950) J. Lab. Clin. Med. 35, 155–160.
- Kurzweg, G. & Massmann, W. (1962) Röntgen-Laboratoriumsprax. 15, 37–40.
- Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375–400.
- Goldenberg, H. & Fernandez, A. (1966) Clin. Chem. 12, 871–882.
- Müller, E. (1935) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 237, 35–39.
- Gomori, S. (1953) Stand. Meth. Clin. Chem. 1, 84–87.

Adresse der Autoren:
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
Diagnostica
CH-4133 Schweizerhalle